

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 43 26 675 A 1

⑯ Int. Cl. 6:
A 61 K 31/68
A 61 K 31/505
A 61 K 31/44
// (A61K 31/68,
31:505,31:44)

D2

⑯ Aktenzeichen: P 43 26 675.4
⑯ Anmeldetag: 9. 8. 93
⑯ Offenlegungstag: 16. 2. 95

⑯ Anmelder:

Medice Chem.-Pharm. Fabrik Pütter GmbH & Co.,
58638 Iserlohn, DE

⑯ Vertreter:

Eitler, W., Dipl.-Ing.; Hoffmann, K., Dipl.-Ing.
Dr.rer.nat.; Lehn, W., Dipl.-Ing.; Füchsle, K.,
Dipl.-Ing.; Hansen, B., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Brauns, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Görg, K.,
Dipl.-Ing.; Kohlmann, K., Dipl.-Ing.; Ritter und Edler
von Fischern, B., Dipl.-Ing.; Kolb, H., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte; Nette, A., Rechtsanw.,
81925 München

⑯ Erfinder:

Pütter, Sigurd, Dr., 58638 Iserlohn, DE; Krauskopf,
Jobst, 58638 Iserlohn, DE; Elstner, Erich F., Prof. Dr.,
82194 Gröbenzell, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verwendung einer Kombination aus Folsäure, Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ zur Vorbeugung von
Nervendegenerationserkrankungen und Altersdementia

⑯ Es wird die Verwendung einer Kombination aus Folsäure,
Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ zur Vorbeugung von Nervendegenerationserkrankungen und Altersdementia beschrieben.

DE 43 26 675 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 12. 94 408 067/59

14/35

DE 43 26 675 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Kombination, bestehend aus Folsäure, Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ zur Vorbeugung von Nervendegenerationserkrankungen und Altersdementia.

5 Während die erfindungsgemäß angesprochene medizinische Indikation bisher in der Hauptsache nur symptomatisch behandelt wurde, soll mit Hilfe der vorgeschlagenen Vitaminkombination ein kausal wirksames Behandlungsverfahren zur Verfügung gestellt werden.

10 Ein Kombinationspräparat, bestehend aus Folsäure, Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ ist bisher erfolgreich eingesetzt worden zur Behandlung peripherer Neuropathien, Vitamin-Mangelzuständen, Durchblutungsstörungen, Kachexien und Leberschäden.

15 Untersuchungen zum Einfluß der genannten Vitamine auf den intermediären Stoffwechsel haben gezeigt, daß sie insbesondere als Cofaktoren im Schwefelaminosäure-Metabolismus und damit im essentiellen C-1-Methylstoffswechsel von Bedeutung sind. Es ist bekannt, daß die genannten Vitamine Co-Faktoren bestimmter Enzyme sind, und daß sie in einigen Fällen katalytische Zentren bedeutender Enzyme des intermediären Stoffwechsels darstellen. Überraschenderweise hat sich ergeben, daß zahlreiche Vitaminmangelzustände mit Krankheiten korrelieren, mit denen man sie primär überhaupt nicht in Verbindung gebracht hatte.

20 Unter bestimmten Stressbedingungen (außergewöhnliche Leistung, Infektionen, Intoxikationen, Traumatisierung, operative Eingriffe und insbesondere Seneszenzprozesse) ist der menschliche Organismus gezwungen, diesen Angriffen auf dem Niveau der Zelle bzw. des Gewebes zu begegnen. Diese Angriffe, so stellte man fest, sind fast immer oxidativer (und im Anschluß daran hydrolytischer) Natur. Im Normalfall genügt die im Körper zur Verfügung stehende Menge an Antioxidantien sowie an antioxidativ wirkenden Enzymen, um den Angriffen zu begegnen. Bei ausgewogener Ernährung werden dem Körper z. B. genügend Hilfsvitamine des antioxidativen Metabolismus (Flavonoide, Pro-Vitamine) zugeführt.

25 Unter den oben erwähnten Stressbedingungen wird jedoch vom Stoffwechsel eine Sonderleistung verlangt: er muß nicht nur die momentane Stresssituation bewältigen, sondern gleichzeitig die, bei diesen Stressvorgängen erzeugten Metaboliten ausscheiden und geschädigte oder zerstörte Zellen und Gewebebereiche reparieren. Von der Geschwindigkeit und Vollständigkeit des Reparaturmetabolismus hängt es in besonderem Maße ab, ob die 30 ursprüngliche Leistungsfähigkeit des Gewebes oder der Organe wieder hergestellt werden kann. Hinsichtlich dieser Reparaturmechanismen sind die Vitamine Folsäure, B₆ und B₁₂ von besonderer Bedeutung. In ihrer metabolischen Funktion als Katalysatoren sind sie nicht nur einzeln wirksam, sondern arbeiten kooperativ. Zusammen mit weiteren Vitaminen, nämlich den Vitaminen E, C und A, sind sie in besonderem Maße verantwortlich für die Vollständigkeit der Wiederherstellung gestörter und zerstörter Gewebe- oder Organbereiche. Eine derartige synoptische Sicht des Vitaminstatus hat man erst in den letzten Jahren gewonnen.

35 Zu den einzelnen Vitaminen der hier zur Diskussion stehenden Kombination ist folgendes auszuführen:

a) Folsäure kann verschiedene Oxidationsstufen der C₁-Übertragungseinheiten von bestimmten Donatoren auf spezielle Akzeptoren transferieren. Dadurch besitzt Folsäure einen bedeutenden Einfluß auf den Aminosäuremetabolismus, wobei sowohl Auf- als auch Abbaureaktionen der Aminosäuren betroffen sind.

40 Besonders die Bildung der fundamentalen Aminosäuren Glycin, Serin und Methionin wird durch Folsäure- sowie auch B₁₂-katalysierte Reaktionen metabolisiert. Folsäure ist darüber hinaus auch am Histidinabbau und an der Glutaminsäuresynthese beteiligt. Die Verbindung Formyl-methionin ist außerdem der Initiator der Proteinsynthese, da sie die erste Aminosäure eines fast jeden neu synthetisierten Proteins darstellt. Auch in die Hämoglobinsynthese und den Aufbau von Phospholipiden des Nervengewebes greift die Folsäure ein.

45 In den meisten Nahrungsmitteln, wie z. B. Leber, Hefe, Getreidekörner, Orangensaft, usw., sind große Folsäuremengen vorhanden. Die Verfügbarkeit der Folsäure aus Lebensmitteln beträgt aber nur 30 bis 80%. Der Folsäurebedarf ist damit ca. 100mal höher als der Bedarf an Vitamin B₁₂, wobei hinzukommt, daß Folsäure wesentlich labiler ist und verhältnismäßig schlecht retiniert wird.

50 Im Harn werden täglich zwischen 1 und 10 µg Folsäure ausgeschieden. Der minimale Tagesbedarf liegt bei etwa 50 µg, was einer benötigten Zufuhr von mindestens 100 µg entspricht. Empfohlen werden 400 µg Fолат pro Tag.

55 Diese empfohlene Mindestmenge wird z. B. in der Bundesrepublik nicht ohne weiteres erreicht. Es ist daher nicht verwunderlich, daß Folsäuremängel zu den häufigsten Avitaminosen gehören, die man allgemein in den Industriestaaten beobachtet. Als Mangelerscheinungen treten eine verminderte Erythrozyten-Konzentration sowie Störungen der Morphologie von neutrophilen Granulozyten auf.

b) Vitamin B₆ (Pyridoxin, Pyridoxinphosphat, Pyridoxal, Pyridoxalphosphat, Pyridoxamin oder Pyridoxamin-5-phosphat) hat eine zentrale Funktion im intermediären Aminosäurestoffwechsel und ist Cofaktor von Transaminasen, die vielfach Schlüsselenzyme darstellen. Bei einer ausgewogenen Ernährung besitzt der Organismus genügend Vitamin B₆, um die erforderlichen Reaktionen ungestört und sättigend katalysieren zu können. Ein Sonderfall ist der Erythrozyt, der besonders wirksam Vitamin B₆ anreichert. Vitamin B₆ wird dabei an Hämoglobin gebunden und besitzt eine wichtige Funktion bei der Freisetzung des Sauerstoffs.

60 Der Vitamin B₆-Stoffwechsel wird vor allem durch die Pyridoxalkinase, die Aldehydoxidase, die Pyridoxaminphosphatoxidase und die alkalischen Phosphatasen getragen. Der menschliche Körper besitzt als Pool etwa 100 mg Vitamin B₆. Davon werden ungefähr 2 mg/Tag mit dem Urin ausgeschieden. Bei Alkoholikern wird neben einer beschleunigten Metabolisierung auch eine reduzierte Synthese des Pyridoxalphosphates beobachtet. Auch bei zahlreichen Erkrankungen tritt ein verstärkter Katabolismus von Vitamin B₆ auf. Eine Akkumulation von Vitamin B₆ im Körper verläuft ohne toxische Nebenwirkungen, denn die Toxizität von Vitamin B₆ ist sehr gering.

65 Eine verstärkte Aufnahme und Speicherung von Vitamin B₆ ist deshalb von zentraler Bedeutung für den Aminosäurestoffwechsel, für die Biosynthese von Porphyrinen, die Quervernetzung des Bindegewebes (Verstär-

kung der elastischen Eigenschaften) für muskuläre Funktionsleistungen sowie für die Interaktion mit diversen Hormonrezeptoren. Vitamin B₆ stellt auch einen Neurotransmitter dar. In neuerer Zeit glaubt man auch, daß Vitamin B₆ Einfluß auf die Blutgerinnung hat, wobei ihm eine anti-arteriosklerotische Funktion zugeschrieben wird.

Stoffwechseldefizite an Vitamin B₆ äußern sich primär als Homocystinämie, Hyperglycinämie und Hyperhistidinämie. Diese Mängelsymptome werden insbesondere bei bestimmten Risikogruppen schneller erreicht. Dazu gehören u. a. Senioren, bei denen trotz einer normalen Ernährung der Vitamin B₆-Status nicht aufrechterhalten wird.

c) Vitamin B₁₂ ist im Körper, besonders in der Leber, in der Niere, in der Milz und im Gehirn angereichert. Seine Halbwertszeit in der Leber beträgt 400, im Plasma dagegen nur 5 Tage. Bei parenteraler Gabe bis zu 1 mg werden 50 bis 75% innerhalb von 2 Tagen ausgeschieden.

Die biochemische Funktion von Vitamin B₁₂ beruht im wesentlichen auf einer Übertragung von Methylgruppen auf verschiedene Akzeptormoleküle. Dies erfolgt in Kooperation mit Folsäure, wobei Vitamin B₁₂ im wesentlichen an der Regenerierung von Tetrahydrofolsäure beteiligt ist. Eine zentrale Bedeutung hat Vitamin B₁₂ bei der Synthese von Thymidin sowie im Biosyntheseweg des Methionins. Hier werden zwei zentrale Funktionen beim Reparaturstoffwechsel angesprochen: Thymidin wird bei oxidativen Angriffen (Mutagenese) bevorzugt verändert, wobei Störungen in der Erbsubstanz, welche die körpereigenen Proteine codiert, auftreten. Die Reparatur solcher Störungen ist also Vitamin B₁₂-abhängig.

Außerdem spielt das Methionin als Schwefelaminosäure eine wichtige Rolle in bestimmten Enzymfunktionen bzw. bei der Übertragung von Methylgruppen. Die Inaktivierung des Methionins durch Oxidation zum entsprechenden Sulfoxid hat weitreichende Folgen. Störungen im Methionin-Stoffwechsel wirken sich auf die Methylierung der Myelinbereiche aus. Somit sind auch Störungen im Lipidstoffwechsel teilweise auf einen Methioninmangel zurückzuführen.

In Abb. 1 und 2 ist schematisch die Beteiligung von B-Vitaminen, darunter Folsäure, Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ am Intermediärstoffwechsel wiedergegeben. Dabei zeigt sich, daß die genannten B-Vitamine in entscheidender Weise den Intermediärstoffwechsel katalytisch beeinflussen.

Wie bereits vorstehend ausgeführt, kooperieren Folsäure, Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ als Cofaktoren im Schwefelaminosäure-Metabolismus und damit im essentiellen C-1-Methylstoffwechsel. Störungen dieses Stoffwechsels sind neben genetischer Prädisposition und Mangelernährung vor allem als Funktionsverluste im Alter zu beobachten. Häufig sind solche Prozesse mit einem erhöhten Homocystein(HC)-Spiegel korreliert.

Unabhängig davon findet man erhöhte Homocystein-Spiegel bereits in Fällen von andauernder Müdigkeit, Unruhe und psychosomatischen Allgemeinbeschwerden. Als auffällige Krankheitsbilder konnten außerdem bei erhöhtem HC-Spiegel Arteriosklerose, senile Dementia, Parkinsonismus und Alzheimersche Krankheit beobachtet werden.

Erst durch neuere diagnostische Methoden (GC-MS, HPLC) im Bereich der Labormedizin und den damit verbundenen verifizierbaren bzw. objektivierbaren Laborkenngrößen konnte der Beweis angetreten werden, daß bei Gabe der erfindungsgemäßen Vitaminkombination pathologisch erhöhte Metabolitenwerte, insbesondere von Homocystein, in Normbereiche gesenkt werden.

Biochemisch sind es drei metabolisch unterschiedliche Bereiche, die mit einem erhöhten HC-Gehalt in direkter Beziehung stehen:

1. Eine oxidative Schädigung durch Übergangsmetall-katalysierte HC-Oxidationen. Diese Oxidationen führen zu Proteinmodifikationen, Membranveränderungen und zur Cooxidation kleiner Moleküle, wie Hydrochinone.

Unter dem Einfluß der Spurenelemente Kupfer und/oder Eisen geht Homocystein in Homocystin über unter Abspaltung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Dieses ist endothel-toxisch. Erhöhte Homocystein-Konzentrationen stellen daher einen Risikofaktor dar, zumal HC in der oxidativ empfindlichen, "atherogenen" LDL-Fraktion transportiert wird. Untersuchungen an Ratten und Affen haben gezeigt, daß es bei einem pathologisch erhöhten Homocystein-Spiegel zu einer Verletzung der Intima kommt, was zu einer Ablösung des Endothels, zu einer Thrombozyten-Aggregation und zur (direkten und indirekten) Stimulation des gerinnungsfördernden Thrombozyten-Thromboxans TXB₂ kommt.

Außerdem ist es leicht verständlich, daß eine aufgerauhte Gefäßwand dem Einfluß von Lipiden viel stärker ausgesetzt ist. Aus der Literatur ist darüber hinaus zu entnehmen, daß hohe HC-Spiegel die Thrombozyten-Aggregation fördert.

2. Additionsreaktionen von HC-Thiolakton mit SH-, NH- und CHO-Gruppen, wobei wiederum Proteinmodifikationen zu wenig effektiven Enzymen und/oder Rezeptoren führen können.

3. Eine defizitäre Methylierungssituation infolge einer verminderten Synthese von "primären" Methylgruppenendonatoren. Dies bedingt wiederum eine verminderte Ethanolamin-Methylierung zu Cholin, welches als Phosphatidylcholin in biologischen Membranen eingebaut, als Cholindonorator für den obligaten Neurotransmitter Acetylcholin dient. In defizitären Notsituationen wird deshalb — zur Aufrechterhaltung der Acetylcholin-abhängigen Neurotransmitterfunktion — Phosphatidylcholin aus der Nervenmembran abgebaut, was zum Funktionsverlust der Membranen und damit zu Erkrankungssymptomen vom oben angesprochenen Typ führt.

Aus den angeführten Veränderungen leiten sich über Membranveränderungen diverse Stoffwechselengpässe ab, welche die oben angeführten Krankheitssymptome auch indirekt zur Folge haben können, oder sie zumindest entscheidend in ihrer Genese oder ihrem Schweregrad mitbestimmen.

Die Methyltransferasen, mit S-Adenosyl-methionin (SAM) als Hauptmethylgruppenendonator, werden durch hohe HC-Spiegel in ihrer Funktion bis zu 60% negativ beeinträchtigt. Bei entsprechend langer andauernder

HC-Anreicherung kann es zu irreversiblen Schäden an den NMDA-Rezeptoren durch Ca^{++} -Einstrom kommen. Dies könnte, neben der Tatsache, daß Mangel an CH_3 -Gruppen Adrenalin und andere Neurotransmitter massiv beeinträchtigt, einer der Gründe für Hirnleistungsstörungen im Alter sein.

5 Ein zusätzlicher Bedarf an Vitaminen ist dann erforderlich, wenn aus medizinischer Sicht eine Avitaminose vorliegt. Dabei geht man aus von der Normalsituation, d. h. dem unauffälligen, symptomlosen Probanden. Die Diagnose des plasmatischen Vitaminpegels orientiert sich an bekannten metabolischen Vorgängen und ihrer Abhängigkeit von den jeweiligen Vitaminen. Eine solche Betrachtungsweise trägt aber den wirklichen Gegebenheiten nicht voll Rechnung, denn es werden dabei folgende Tatsachen nicht mit einbezogen:

10 a) Mit zunehmender oxidativer Schädigung (Alter, Infektionen, ischämische Begebenheiten) vermindern sich die Affinitäten für die Transportvektoren und Rezeptoren (Apoenzyme) der angesprochenen Vitamine. Man stellt hier ein sogenanntes "wobbling" fest, ein Begriff, der insbesondere im Zusammenhang mit dem genetischen Code bekannt ist. Im vorliegenden Fall will dieser Begriff zum Ausdruck bringen, daß ein Protein infolge einer molekularen Veränderung weniger effizient ist, um eine metabolische Leistung zu vollbringen. Im Falle einer Vitamin-abhängigen Katalyse bedeutet dies, daß trotz unauffälliger Serumwerte für das Vitamin, die von ihm geleistete Katalyse deutlich unter den "Normal"-Anforderungen liegt. Aufgrund einer weniger effizienten Katalyse kommt es zu einer verminderten Produktbildung, die sich erst dann wieder normalisiert, wenn der "Coenzymdruck" und dadurch die Geschwindigkeit der Katalyse erhöht wird, d. h. also wenn dem Körper mehr Vitamin eines bestimmten Typs, als es der "Normalbedarf" erfordert, zugeführt wird.

15 b) Die hier angesprochenen Vitamine besitzen über die bekannten Katalysefunktionen hinaus noch weitere metabolische Funktionen. Diese Auffassung ist neu und gilt nach letzteren Befunden insbesondere für das Vitamin B_6 , welches über sein N-zentriertes Radikal ein hervorragender Radikalscavenger für C-, S- und N-zentrierte Radikale der atherogenen, aber auch anderer pro-oxidativer Stoffwechselreaktionen ist.

20 Für das Vitamin B_{12} haben sich überraschenderweise ähnliche, nicht Methylgruppen-transferierende Funktionen ergeben, nämlich im Zusammenhang mit dem Energiemetabolismus und dem Neurotransmitter-Amin-Metabolismus (insbesondere im Zusammenhang der Stoffwechselsynthese von Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin).

25 c) Homocystein-initiierte Cooxidationen sind ortsspezifisch. Durch die für HC charakteristische, ortsgebundene oxidative Eigenschaft schädigt das HC Enzymfunktionen in seiner unmittelbaren Nachbarschaft.

30 Diese Schädigung ist insbesondere an Enzymen zu beobachten, die als Cofaktoren die oben angesprochenen Vitamine benutzen. Dies bedeutet, daß — wenn durch irgendeinen Auslöser der HC-Wert ansteigt — damit auch automatisch eine potentielle Malfunktion der Enzyme angedeutet ist, welche im Bereich des HC katalytisch aktiv sind. Solche Enzyme sind bekanntmassen Enzyme des Schwefelaminosäure- und Methylgruppen-Metabolismus.

35 Aus dem oben Gesagten ergibt sich, daß eine HC-Erhöhung zu Erkrankungen, wie Arteriosklerose, Parkinsonismus, Alzheimer und seniler Dementia führen kann. Bei einer ausreichenden Gabe einer Kombination von Folsäure, Vitamin B_6 und Vitamin B_{12} ist eine Korrektur des Vitamin-Pegels und damit der vorstehend genannten Affinitätsverluste bzw. der oxidativ reduzierten Funktion der korrespondierenden Apoenzyme möglich.

40 Experimentelle Befunde

1. Es wurde experimentell gezeigt, daß HC ortsspezifisch oxidativ wirkt und Moleküle in unmittelbarer Nachbarschaft schädigt. Dagegen werden Moleküle, welche mehr an der Peripherie liegen, nicht erreicht; solche Moleküle können durch zelluläre Antioxidantien, wie Glutathion, etc., geschützt werden.

45 2. Es wurde gezeigt, daß HC oxidativ Substrate seines eigenen Metabolismus (Methionin und dessen Derivate) sowie biogene Amine vom Dopamin-Adrenalin-Typ zerstört und damit wie eine "überschießende" Monoamino-oxidase (MAO) wirkt. Letzteres erklärt die Störungen neuraler Funktionen. Außerdem konnte gezeigt werden, daß Vitamin B_6 und Vitamin B_{12} diesen destruktiven Angriff retardieren.

50 3. Im Gegensatz zum homologen Cystein kann HC ein Endolacton (Thiolacton) bilden, welches Additionsreaktionen eingeht und sich an essentielle Biomoleküle in der unmittelbaren Nachbarschaft addiert und dabei diese inaktiviert. So konnte gezeigt werden, daß ein erhöhtes Angebot der hier infrage stehenden Vitaminkombination diesen Effekt reduziert.

55 Die vorstehenden experimentellen Befunde erlauben den überraschenden Schluß, daß durch eine erhöhte Homocystein-Konzentration ausgelöste Reaktionen, welche Blutgefäße und Nervengewebe negativ beeinflussen, mittels erhöhter Gaben einer Vitaminkombination aus Folsäure, B_6 und B_{12} verhindert bzw. vermindert werden können. Der genannten Vitaminkombination, in welcher die einzelnen Vitamine kooperativ und synergistisch miteinander wirken, kommt damit über ihre bekannten Einzelfunktionen hinaus ein bedeutendes Schutz- und Katalyseprinzip zu. Wie nachfolgende Versuche zeigen, ist die beanspruchte Dreierkombination auch jeder möglichen Zweierkombination überlegen.

60 Herstellung von erfundungsgemäßen Vitaminkombinationen:

a) Für eine erfundungsgemäße Vitaminkombination, die zur Injektion bestimmt ist, werden in jeweils 5 ml die folgenden Komponenten formuliert:

65 Folsäure	1 mg
Vitamin B_6	5 mg
Vitamin B_{12} (Hydroxycobalamin)	1 mg

b) Für eine Präparation, die zur oralen Verabreichung bestimmt ist, wird eine Filmtablette formuliert, die folgende Bestandteile enthält:

Folsäure	0,2 mg	5
Vitamin B ₆	8 mg	
Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin)	0,01 mg	
Hilfsstoffe		

Den erfindungsgemäßen Vitaminpräparationen können Hilfsstoffe zugegeben werden, wie z. B. Substanzen zur pH-Einstellung, Lidocain als Lokalanästhetikum, NaCl zur Einstellung der Tonizität, etc. 10

Die Verwendung von Hilfsstoffen richtet sich nach der jeweiligen Verabreichungsform. Es ist insbesondere vorgesehen, die erfindungsgemäße Vitaminkombination für die orale und parenterale Verabreichung zu formulieren.

Die Kombination der erfindungsgemäß verwendeten Vitamine vom Typ B kann, je nach der Verabreichungsform, variieren. Vorgesehene Konzentrationsbereiche für die einzelnen Komponenten sind wie folgt: 15

Folsäure 0,1 – 5 mg, vorzugsweise 0,2 – 1 mg
 Vitamin B₆ 1 – 100 mg, vorzugsweise 5 – 10 mg
 Vitamin B₁₂ 0,01 – 2 mg; vorzugsweise 0,01 – 1 mg 20

Experimentelle Arbeiten

Im folgenden soll untersucht werden, in welchem Maße die erfindungsgemäße Kombination aus Vitamin B₆, B₁₂ und FS (Folsäure) oder eine Zweierkombination der genannten Einzelkomponenten in der Lage ist, einen erhöhten Homocysteinspiegel abzubauen. 25

I. Versuchsdurchführung

Zur Untersuchung der Stoffwechselwege des Homocysteins wurde die ¹³C – NMR-Spektroskopie an isolierten Schweinehepatozyten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde 2,4-¹³C-Homocystein synthetisiert. Die zweifache Isotopenmarkierung wurde gewählt, um sowohl Information von C₂-Kohlenstoffatome, als auch über die C₄-Kohlenstoffatome zu erhalten. 30

1. Isolierung und Aufreinigung von Schweinehepatozyten

Es wurde von Leberlappen von Säuen und kastrierten Ebern (5 und 15 Monate) ausgegangen. Um dieses Projekt nicht durch krankhafte Tiere zu gefährden, wurden ausschließlich Schweine verwendet, die weder Krankheitssymptome aufzeigten, noch mit veterinärischen Medikamenten behandelt wurden.

Die Leberlappen wurden gegebenenfalls mittels eines sterilen Skalpells verkleinert, so daß sie etwa ein Gewicht von 150 g besaßen. Dann wurde jede Leber mit 500 ml eiskalter 0,9%iger NaCl-Lösung mit Hilfe einer 50 ml Spritze gespült. Zum Transport wurde sie in 1 l eiskalte 0,9%ige NaCl-Lösung gelegt und zur Perfusionsanlage transportiert. 40

Jede Leber wurde in einen Büchnertrichter gelegt und über Pipettenspitzen (20 – 200 µl) mit den Medien versorgt. Der Oxygenator war mit einer Peristaltikpumpe (120 ml/min) und einem Gaszylinder mit O₂ = 95% und CO₂ = 5% (ca. 2 Blasen/Sekunde) verbunden. Das gesamte System befand sich in einem 40°C temperierten Wasserbad. Während der Perfusion wurde der Druck im System zwischen 40 und 60 cm Wasserdruk eingestellt und über ein offenes Manometer kontrolliert. 45

Jede Leber wurde dann in 1,1 l Puffer (8,3 g NaCl, 0,5 g KCl, 2,4 g Hepes pro liter) und anschließend mit 400 ml einer Collagenaselösung (200 mg Collagenase in 100 ml Puffer, bestehend aus 3,9 g NaCl, 0,5 g KCl, 24 g Hepes, 0,7 g CaCl₂ · 2H₂O pro Liter) unter Rezirkulation gespült. Während der gesamten Perfusion wurde darauf geachtet, daß das Gewebe immer gleichmäßig durchspült wurde und sich in den Schläuchen keine Luftblasen bildeten. War die Leber stark geschwollen und bildete sich sogenannter Schweiß an der Oberfläche, mußte die Perfusion beendet werden. 50

Die Leber wurde dann in ein steriles Gefäß mit etwas Puffer (2,0 g BSA, 9,91 g HBSS (= Hanks balanced salt solution), 2,4 g Hepes) gegeben und in kleine Stücke geschnitten. Die entstehende Suspension wurde über einen Büchnertrichter und anschließend über ein 250 µm Nylonfilter gefiltert. Der Filter wurde mit eiskaltem Puffer (wie vorstehend) gewaschen. Das BSA in diesem Puffer inaktiviert die Collagenase, so daß keine weiteren Zellen zerstört werden. Das Filtrat (ca. 200 ml) wurde auf vier 50 ml Zentrifugenröhren aufgeteilt und etwa 5 min bei 4°C inkubiert. 55

Anschließend wurde die Suspension 4 min bei 4°C und 100 g zentrifugiert (Sorvall RC-3B). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet (Hepatozyten) in Puffer (9,91 g HBSS, 4,8 g Hepes) resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 100 ml Williams Medium E aufgenommen und über ein 250 µm Nylonfilter gefiltert. Eine Probe des Filtrats wurde mit der Trypanblaulösung 1 : 1 verdünnt, die wiederum 1 : 1 mit dem Medium verdünnt wurde, so daß letztlich eine Verdünnung von 1 : 4 vorlag. 60

Nach 5 Minuten wurden die Zellen in einer Bürker-Zählkammer ausgezählt und ihre Lebensfähigkeit bestimmt. 65

2. Inkubation mit 2,4¹³C-Homocystein

Pufferzusammensetzungen

Waschpuffer (pH 7,4):

5 118 mM NaCl
 4,8 mM KCl
 1 mM KH₂PO₄
 1,2 mM MgSO₄ · 7H₂O
 1 mM Glucose
 10 3,4 mM CaCl₂

Inkubationspuffer (pH 7,4):

+ 0,3 mM Serin
 + 5 mM 2,4¹³C-Homocystein

15 Isolierte Hepatozyten wurden mit dem Waschpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die so erhaltenen Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 10 ml aufgenommen. Alle Inkubationen wurden in 20 mm NMR-Röhrchen durchgeführt. Die Zellen wurden während der Inkubation mit Carbogen begast, um physiologische Bedingungen aufrechtzuerhalten. Zudem wurden Waschflaschen vorgeschaltet, um Volumenverluste auszugleichen.

20 Der Inkubationspuffer (ca. 18 ml/Röhrchen) wurde in den Röhrchen auf 37°C temperiert. Die Vitaminkonzentration wurde bezogen auf den Vitamingehalt der erfundungsgemäßen Kombination (Vitamin B₆ 5 mg/4 ml, Vitamin B₁₂ 1 mg/4 ml, Folsäure 1,1 mg/4 ml) und umgerechnet auf eine Leber von 500 g. Bei einem Inkubationsvolumen von 2 ml Leberzellen bedeutet dies eine durchschnittliche Vitaminkonzentration, bezogen auf 1 g Feuchtgewicht, der nachstehenden Werte: B₆ 10 µg/g, B₁₂ 2 µg/g, Folsäure 2,2 µg/g. Nach 30 Minuten wurde die Inkubation beendet, indem die Zellen auf Eis gestellt wurden. Dadurch verlangsamte sich schlagartig ihre Stoffwechselleistung. Anschließend wurden die Zellen im Inkubationspuffer 5 Minuten bei 2000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -45°C und 5 · 10⁻² Torr gefriergetrocknet. Nach der Gefriergetrocknung wurden die Überstände in 2 ml bidestilliertem Wasser aufgelöst und mit 200 µl D₂O und 200 µl Dioxan versetzt und vermessen.

3. Zellextraktion

35 Die Pellets wurden einmal im Waschpuffer resuspendiert und wiederum 5 Minuten bei 2000 UpM und 4°C zentrifugiert. Um an die Inhaltsstoffe der Zellen zu gelangen, wurden diese wie folgt durch die Behandlung mit Perchlorsäure aufgeschlossen:

40 Die Zellpellets wurden unter N₂ zermörsert. Ein Gramm Feuchtgewicht wurde mit einem Milliliter 6%iger HClO₄ 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde gesammelt und das Pellet erneut mit 6%iger HClO₄ auf Eis inkubiert und zentrifugiert (10 min/3000 UpM/4°C). Auch dieser Überstand wurde gesammelt und mit dem ersten Überstand vereinigt. Alle Überstände wurden nun mit 2 N KOH auf einen pH von 7,4 eingestellt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Das dabei ausgefallene Perchlorat wurde 10 Minuten bei 4000 UpM abzentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -45°C 5 · 10⁻² Torr gefriergetrocknet.

45 4. Experimentelle NMR-Spektroskopie

Alle Spektren wurden an einem AMX 400 WB NMR-Spektrometer der Firma Bruker aufgenommen. Folgende Geräteparameter dienten zur Aufnahme der ¹³C-Spektren:

50 90° Puls: entspricht 13,5 µs
 TD = 32 K Datenmatrix
 NS: 20000 Zahlen der Akkumulationen
 D1: 2 S Wartezeit zwischen aufeinanderfolgenden Pulsen
 DS: 2 dummy scans

55 Für die NMR-Messungen in einem 10 mm Röhrchen wurden die Proben wie folgt aufgelöst: Die gefriergetrockneten Proben wurden in 2 ml H₂O aufgenommen und auf den pH von 7,4 eingestellt. Die Proben wurden 10 Minuten bei 4°C und 3000 UpM zentrifugiert. 2 ml des erhaltenen Überstandes wurden mit 0,2 ml 5 M Dioxan und 0,2 ml D₂O versetzt.

60 5. Auswertung der ¹³C – NMR-Daten

65 Bedingt durch die Überlappung vieler C₂-Resonanzen, wurden nur die C₄-Resonanzen zur Auswertung verwendet. Die C₄-Resonanzen von Homocystein (Hcys), Methionin (Met), Cystathionin (Cyst) und S-Adenosylhomocystein (SAH) wurden genau zugeordnet. Die C₄-Resonanzen von Hydrolyse- und Abbauprodukten (z. B. Homolanthionin und 2-Hydroxy-4-mercaptoprobutyrate-homocystein-disulfid) ergeben überlappende Resonanzen bei 33,9 ppm. Zur Quantifizierung eines Peaks "x" wurden die entsprechenden Peakintensitäten durch die Intensität der CH₂-Gruppe in Dioxan (interner Standard) dividiert. I^x_r-Int x/Int Dioxan.

II. Ergebnisse

Für die Untersuchung des Einflusses der infrage stehenden Vitamine auf den Homocysteinstoffwechsel sind überwiegend die Überstände der inkubierten Hepatozyten mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie untersucht worden, da Homocystein- und Methioninstoffwechselprodukte "in vivo" extrazellulär (z. B. im Serum) zu detektieren sind. Folglich sind diese Stoffwechselprodukte in den erhaltenen Überständen zu finden.

Es wurde festgestellt, daß für die Auswertung nur die C₄-Resonanzen von Bedeutung sind. Die intensivste Resonanzlinie bei 33,9 ppm kann den Homocysteinabbauprodukten Homolanthionin und 2-Hydroxy-4-mercaptop-to-butyrat-homocystein-disulfid (jeweils C₄) zugeschrieben werden. Weiterhin sind die C₄-Resonanzen von Methionin, Homocystein, Cystathionin, S-Adenosylhomocystein (SAH), Ketobutyrat und Gluthation identifiziert worden.

1. ^{13}C -NMR Untersuchungen an Zellextrakten von Schweinehepatozyten

Routinemäßig wurden ^{13}C -NMR-Spektren der Zellextrakte aufgenommen und untersucht. In einigen dieser Spektren wurden Spuren der markierten Metabolite Homocystein, Methionin und Cystathionin gefunden, welche jedoch die nachstehend unter 2. beschriebenen Untersuchungen nicht beeinflussen. Die gefundenen Hinweise auf die genannten Metabolite sind in keinem Fall signifikant, da sie nur eine geringfügig höhere Intensität als die Rauschsignale aufweisen. Es zeigten sich jedoch Signale von natürlich vorkommenden Verbindungen, z. B. der Aminosäuren Taurin, Alanin und Valin sowie Phosphorylcholin.

2. Verteilung der ^{13}C -Markierung von 2,4- ^{13}C -Homocystein

Der Einfluß der Vitamine auf den Homocysteinabbau läßt sich am besten an Hand der relativen Intensität (I^x_r) der verschiedenen Metaboliten darstellen. Die Effekte der einzelnen Vitamine, Vitaminkombinationen und der erfundungsgemäßen Kombination sind in der nachfolgenden Tabelle I dargestellt. Die Werte für I_r wurden auf 100% des Kontrollversuches bezogen. Die Ergebnisse der Experimente mit Vitaminen und Vitaminkombinationen sind ebenso relativ zu den Kontrollversuchen in Prozent ausgedrückt.

Aus der Tabelle I geht hervor, daß S-Adenosyl-Homocystein bis zu einer Grenzkonzentration gebildet wird und dann ein Abbau von anderen Produkten als Cystathionin und Methionin erfolgt. Die Abweichungen (ca. 15%) des Gesamt- ^{13}C -Pools sind durch unterschiedliche Akkumulationen der ^{13}C -markierten Metabolite in den Hepatozyten begründet.

Dieser Effekt ist in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt worden.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0

Tabelle I

Ergebnisse der ^{13}C -NMR-Überstände von Schweinehepatozyten, die 30 Minuten mit 2,4- $^{13}\text{C}_2$ -Homocystein inkubiert worden sind
(I_r: Relativer Fluß der ^{13}C -Markierung in Metabolit X (I_r^x = Int x/Int Dioxan)

Vitamine	Mcl/Cyst	I _r Mcl (rel.)	I _r Cysl (rel.)	I _r Heys (rel.)	I _r SAH (rel.)	I _r 33.9 (rel.)	I _r Sonst (rel.)	I _r p (rel.)	I _r C9 (rel.)	d _{SE} %
-	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	10
B ₆	56.7	65.5	118.0	37.5	93.9	112.4	110.5	111.0	99.7	12
B ₁₂	130.0	110.3	85.0	77.6	110.9	126.6	109.1	119.1	112.7	12
FS	136.7	132.9	98.0	67.7	139.3	118.7	131.3	117.1	113.1	14
Medivitan	80.0	119.2	150.2	12.7	144.5	141.6	135.9	140.3	120.7	14
B ₆ , B ₁₂	136.7	88.5	65.9	30.3	105.1	113.1	138.8	116.3	103.1	9
B ₆ , FS	113.3	135.9	122.2	49.6	131.6	125.9	152.1	132.9	120.1	12
B ₁₂ , FS	126.6	115.0	93.1	62.4	122.5	122.8	122.4	123.5	114.1	1

8 Ann.: Mcl: Methionin, Cyst: Cystathionin, Heys: Homocystein, SAH: S-Adenosylhomocystein. 33.9 bedeutet die Summe der Resonanzen bei 33.9 ppm, diese sind Glutaminprodukte wie Homolanthionin und 2-Hydroxy-4-mercaptop-butyryl-homocystein-disulfid. Sonst: Sind Metabolite wie Ketobutyryat und ca. 8 nicht identifizierte Produkte.
I_r: Summe aller ^{13}C markierten Metabolite, die aus ^{13}C -Heys entstanden sind.
I_rC9: Gesamtpool an ^{13}C Markierung.

III. Diskussion der Versuchsergebnisse

Für den Homocysteinabbau gibt es zwei Stoffwechselwege: erstens über Methionin, und zweitens über Cystathionin. Aus diesem Grunde wird im folgenden ein Vergleich der Versuche mit den einzelnen Vitaminen und deren Kombination mit Experimenten ohne Vitamine durchgeführt. Die signifikanten Änderungen der Methionin- und Cystathioninkonzentrationen sind in der nachfolgenden Tabelle II dargestellt.

5

Tabelle II

Vitamin	C _{Met} %	C _{Cyst} %	
-	100	100	10
B ₆	66	118	15
B ₁₂	110	82	20
FS	133	98	25
B ₁₂ + B ₆	87	66	30
B ₆ + FS	136	121	35
B ₁₂ + FS	114	94	40
B ₆ + B ₁₂ + FS (Medivitan)	120	150	45

Die Daten aus der vorstehenden Tabelle zeigen, daß beide Stoffwechselwege miteinander gekoppelt sind. Die Werte für Met/Cyst (Spalte 1 in Tabelle I) liegen — unter Berücksichtigung der Fehlergrenze — in vier Fällen bei ca. 130%. Dieses Verhältnis ändert sich zugunsten des Stoffwechselweges über Cystathionin bei Zugabe von B₆, B₆ und FS oder B₆, B₁₂ + FS. Aus Tabelle I ist weiterhin ersichtlich, daß über die gesamte Versuchszeit betrachtet, die relativen Konzentrationen der Homocysteinabbauprodukte etwa konstant sind. Dies bedeutet, daß der Überschuß an Homocystein auf zwei Wegen abgebaut wird:

30

35

- 1) In beiden Stoffwechselwegen über Methionin, SAH und Cystathionin,
- 2) über die Abbauprodukte Homolanthionin und 2-Hydroxy-4-mercaptopo-butyrat-homocystein-disulfid, sowie ein Hydrolyseprodukt.

Tabelle I zeigt weiterhin, daß bei Zusatz der erfindungsgemäßen Vitaminkombination die Homocysteinkonzentration in überraschenderweise absinkt. Dagegen werden für I^{SAH}, I^{SONST}, und I^{33,99}, die höchsten Werte gefunden.

40

Die vorliegenden Versuche bestätigen somit eindeutig, daß mit Hilfe der erfindungsgemäß verwendeten Vitaminkombination der Homocysteinspiegel gesenkt und damit eine prophylaktische bzw. kurative Verbesserung des in Anspruch 1 angesprochenen Krankheitssymptoms erzielt wird.

45

Patentansprüche

1. Verwendung einer Kombination aus Folsäure, Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ zur Vorbeugung von Nerven-degenerationserkrankungen und Altersdementia.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Kombination die Vitamine vom Typ B in folgenden Konzentrationen enthält:
Folsäure 0,1—5 mg, vorzugsweise 0,2—1 mg
Vitamin B₆—100 mg, vorzugsweise 5—10 mg
Vitamin B₁₂ 0,01—2 mg; vorzugsweise 0,01—1 mg
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Vitaminkombination zur oralen oder parenteralen Verabreichung formuliert wird.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Vitaminkombination als Injektionslösung formuliert wird.
5. Verwendung nach Anspruch 1 bis 4, zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmittel, Adjuvans oder Trägermittel.
6. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, wobei als Hilfsstoffe Substanzen zur pH-Einstellung oder zur Einstellung der Tonizität zugegeben werden.

50

55

60

65

65

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Abb. 1

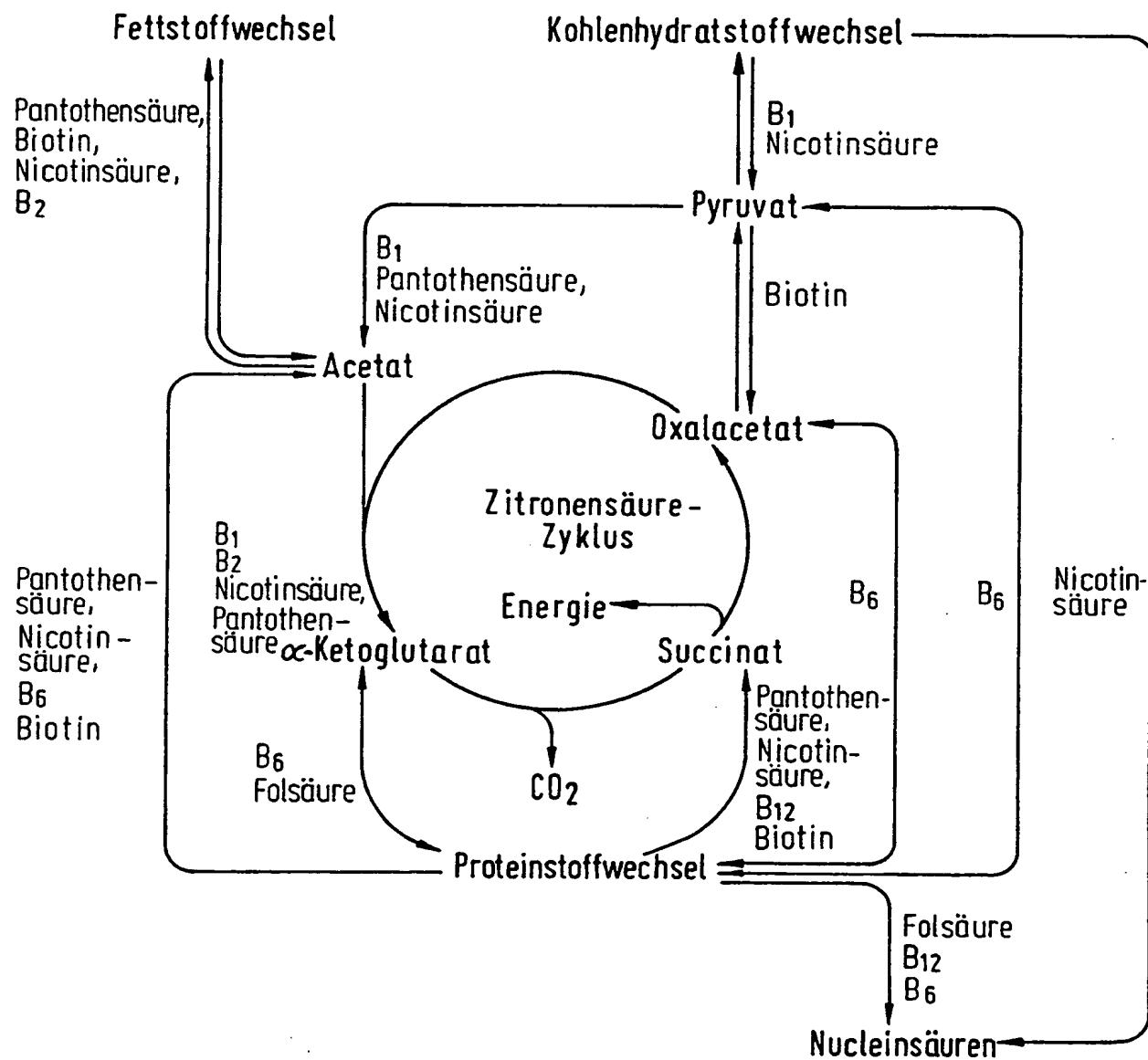


Abb. 2

